

氏名(本籍)	加藤梨沙(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第78号
学位授与年月日	令和3年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	自閉スペクトラム症モデルマウスにおける社会認知能力の解析
論文審査委員	(主査) 茂木一孝 (副査) 菊水健史 塚本篤士

論文内容の要旨

【総合緒言】

自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder, ASD) の診断基準には、社会的相互作用の障害と認知行動の柔軟性欠如が挙げられている。しかしその症状は ASD 当事者間で異質性が高い。ASD の発症には、関連候補遺伝子の変異と、母親の服薬や感染症といった胎生期環境要因とがおおよそ 50% ずつ関与しているが、これらの因子は単独で ASD 発症に関与するだけでなく、多くの場合は複数の遺伝子間および遺伝子と環境因子との相互作用が発症を促進させると言われている。ASD を科学的に理解するためには、関連遺伝子ごとまたは環境因子ごとに細分化してその表現型を評価することが重要であり、このことは ASD 当事者の個別のニーズに適切に対応する上でも必須だと考えられる。また、ASD の認知能力は、社会生活において困難さを引起すケースが多いが、状況によっては適応的に機能する可能性も考えられる。しかし、これらの観点からの検討は、ヒトでは環境を統制した長期間の表現型追跡が難しく、これまでほとんどない。

ヒトで実証困難な個別的且つ長期的な ASD の表現型追跡を実現させるために、本研究では ASD 関連遺伝子の 1 つである TBX1 の変異マウスと、ASD の胎児期環境要因の 1 つであるバルプロ酸を暴露させたマウスをモデルとして用いた。人為的状況変化であられる認知能力を数週間から数ヶ月にわたり評価することで、ASD の行動表現型が出生後の環境条件に応じてどのように変化していくのかを明らかにするとともに、認知能力を向上させるような環境要因を探索することを目的とした。

【第 1 章 遺伝要因 ASD モデルマウスにおける社会認知能力の解析】

ASD 関連遺伝子の 1 つである Tbx1 の変異マウス (Tbx1 HT) を用い、Tbx1 HT が日常生活で他個

体と一緒に過ごす中でお互いに相手の状況に応じてどのように行動を調整してきたかの 2 個体間関係性が反映される行動を、発達段階ごとに評価した。

実験 1 では、授乳期の Tbx1 HT 仔マウスと野生型 (WT) 母マウスの母仔間関係性を、仔の超音波発声に対する母の応答性に基づいて評価した。その結果、Tbx1 HT 仔を養育する WT 母は、WT 仔を養育する WT 母に比べて、自分の養育する仔の超音波発声への反応性が低かった。このことから、たとえ聴き慣れた Tbx1 HT 仔の鳴声であっても、定型とは異なる鳴声の原因となって母仔双方の社会認知能力を介したやり取りが障害されることが示唆された。

実験 2 では、離乳後幼少期の兄弟間関係性を、社会的条件づけ場所選好 (SCPP) テストで評価した。SCPP テストは、他個体との交流時の記憶が強化されるほど、一緒に過ごした場所を好んで滞在時間が長くなることから、他個体交流の社会的報酬性を評価できる。SCPP テストの結果、Tbx1 HT は相手が WT であっても Tbx1 HT であっても、他個体交流の社会的報酬性が低かった。Tbx1 HT は社会認知能力の異常の他にも、空間認知能力の異常によって場所と交流経験との連合記憶が強化されなかった可能性も考えられた。一方 WT の場合、相手が WT だと社会的報酬性が高いが、相手が Tbx1 HT だと低かった。WT 同士では社会的報酬性が高いことから、WT と Tbx1 HT との間では、Tbx1 HT の社会認知能力の異常によって社会的相互作用が障害されていた可能性が考えられた。

実験 3 では、性成熟後の雌雄性間関係性を、WT 発情メスと同居時の Tbx1 HT オスの超音波発声と性行動から評価した。その結果、性成熟後の Tbx1 HT のオスの超音波発声は、WT オスよりもピッチが高く、call の持続時間が短かった。また性行動に費やす時間自体は WT と同等であるものの、性行動の開始が WT よりも遅かった。このことから、性成熟後の Tbx1 HT オスと WT メスとのやり取りは、WT の雌雄間のやり取りとは異なることが示された。

実験 1 から実験 3 より、Tbx1 の変異に起因する社会的相互作用の障害は、授乳期母仔間・幼少期兄弟間・性成熟後の雌雄間で一貫して認められることが明らかとなった。

【第 2 章 胎生期環境要因 ASD モデルマウスにおける認知能力の解析】

妊娠中の母マウス (C57BL/6 系統) にバルプロ酸 (VPA) を経口投与し、胎生期に VPA に暴露された環境要因の ASD モデルマウス (VPA マウス) を用いた。VPA マウスにおいては、成体海馬でのニューロン新生の低下とそれに起因する学習機能の異常が報告されている。さらに、これらの異常は離乳後から身体運動を経験することで正常化することも示されている。これら先行研究より、日常の運動の積み重ねによって、成体期の行動表現型も変化する可能性が考えられた。

そこで実験 4 では、成体 VPA マウスの空間エンリッチメント経験による認知能力の変化を解析した。具体的には、50 cm 四方に高さ 25 cm の登り棒を 120 本立てた放飼場で 1 週間生活させることで、標準的なマウスケージ内よりも運動量を増加させた。この空間エンリッチメント経験の前後で、場所物体認知テスト・スリーチャンバーテスト・強制水泳テストに供し、それぞれからわかる空間認知能力・社会認知能力・ストレス負荷時の対処行動の変化を、通常の C57BL/6 マウス (WT マウス) の場

合と比較した。空間エンリッチメント時の1週間の行動は自動行動分析システム Live mouse tracker (LMT) を用いて追跡した。また、これまで胎生期 VPA 曝露モデル動物の表現型の異常はオスにおいて特に頑健に示されていることから、行動表現型の性差についても検討した。

結果として、オスの VPA マウスではエンリッチメントの経験により空間認知能力が向上したが、社会認知能力は向上しなかった。一方、オスの WT マウスではエンリッチメントにより空間認知能力と社会認知能力が共に上昇した。またメスでは VPA マウスおよび WT マウス共にエンリッチメントによる空間認知能力の向上が見られなかった。これらのことから、オスでは胎生期 VPA 曝露によって社会認知能力の可塑性に関わる神経回路形成が阻害されたことが考えられた。また空間認知能力の可塑性に性差があることも示唆された。

ストレス負荷時の対処行動をみる強制水泳時の不動時間は、VPA マウスの方が WT マウスよりも長く、VPA マウスは定型とは異なる行動表現型を示したが、エンリッチメントの経験はこのことに影響しなかった。雌雄の比較では、不動時間はオスがメスよりも長かった。同様の性差は、空間エンリッチメント生活中の LMT での行動解析でも認められ、VPA マウスおよび WT マウスのどちらにおいてもオスはメスよりも壁際に滞在しがちであった。

実験4から、VPA マウスでも空間エンリッチメントによる日常の運動の積み重ねによって成体期の行動表現型が変化し、空間認知能力が向上することが明らかとなった。しかし、この効果はオスでのみ認められたため、運動による VPA の成体期表現型可塑性は、性差の影響を受けていることが示唆された。

【総合考察】

第1章の遺伝要因の Tbx1 HT マウスを用いた解析では、発達を通して社会的相互作用の障害が一貫して見られることが明らかとなった。Tbx1 の変異に起因する社会認知能力の障害の程度は、同居相手という出生後環境要因によって変化しないことが示唆された。第2章の胎生期環境要因の VPA マウスを用いた解析では、空間エンリッチメントという出生後環境要因を付加することにより、オスでは社会認知能力は向上しなかったものの、空間認知能力の向上が見られた。このことから、空間エンリッチメントによる日常の運動の積み重ねによって、オス VPA マウスの行動表現型が変化することが示唆された。

本研究からは、出生後の環境条件に応じた ASD の行動表現型の可塑性は、社会認知能力よりも空間認知能力を介したもので高いことも示唆された。空間認知能力は状況に応じた行動調整に不可欠な要素であるため、空間認知能力の向上は適応的と考えられる。遺伝要因の Tbx1 HT においても空間エンリッチメントによる効果がどのようにあられるのか今後の調査が待たれる。また、本研究の VPA マウスでは、空間認知能力の可塑的变化とストレス負荷時の対処行動に性差が見られた。今後は遺伝要因と胎生期環境要因に雌雄の性の要素も加えた上で、因子ごとの細分化した ASD 表現型追跡が行われ、ヒト ASD に伏在する個別ニーズに対応することが重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は社会的相互作用の障害と認知行動の柔軟性欠如を特徴とする自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder, ASD)のモデル動物を利用して、ASD の発症要因ごとの行動表現型が環境条件に応じてどのように変化するかを解析し、ASD 表現型の改善策を検討することを目的とした内容である。論文は2章から構成されている。第1章では ASD 関連遺伝子の1つである Tbx1 の変異マウスを用い、授乳期の母子間関係性、離乳後幼少期の兄弟間関係性、性成熟後の雌雄性間関係性を解析し、社会相互作用の障害が一貫してみられることを見いだしている。第2章では ASD の胎生期の発症要因である抗てんかん薬のバルプロ酸 (Valproic acid, VPA) を妊娠中に投与された母マウスから生まれた VPA マウスを用い、成体期の行動表現型が空間エンリッチメント経験によって変化するかを解析している。空間エンリッチメント経験は社会認知能力には効果がなかったが、空間認知能力を向上させることを見出している。本研究の成果は、様々な発症要因を背景に症状の異質性が高い ASD の全体像を理解し、その対応方法を考えるうえで有用な知見だと考えられる。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

ASD の発症には、関連候補遺伝子の変異、また母親の妊娠期の服薬および感染症といった様々な発症要因が単独または相互に関連して寄与していると考えられている。これらことが ASD 全体像の理解と対応方法を考える大きな障害となっている。本研究テーマは、想定されている ASD 個々の発症要因のモデル動物を使うことで、その障害克服に向けた1つのストラテジーを提言するものである。また、ASD への対応方法の確立は社会においても大きな問題であり、社会的にも重要なテーマ設定だと考えられる。

2) 研究の背景

ASD の診断基準は社会的相互作用や認知機能の障害とされているものの、ASD の症状は異質性が高く、ASD 当事者個々のニーズに適切に対応することが求められている。また、ASD の症状は環境や社会経験によって改善する可能性を示唆する報告もあるが、ヒトでは環境を統制した長期間の表現型追跡が難しいことなどもあり、どのような環境や経験が表現型改善に重要かは明確にされていない。本研究はこれらの現状や先行研究をよく分析し、2つの発症要因のモデル動物を用いて長期的な表現型追跡を実施するなど、研究の背景を踏まえて的確な実験を実施している。

3) 研究の方法

第1章では ASD 関連遺伝子の1つである Tbx1 の変異マウスを用いている。授乳期の母子間関係性

は、Tbx1 変異の仔マウスまたは野生型の仔マウスを養育している野生型の母マウスに対して、超音波スピーカーで仔マウス超音波発声を聞かせた際の反応を解析している。離乳後幼少期の兄弟間関係性は、他個体との交流が社会的報酬性となるかを評価できる社会的条件づけ場所選好テストを用いている。また、性成熟後の雌雄間関係性は野生型の発情メスマウスと同居している Tbx1 変異オスマウスの超音波発声と性行動を解析している。第 2 章では VPA を妊娠中に投与された母マウスから生まれた VPA マウスを用い、成体期に 50 cm 四方に高さ 25 cm の登り棒を 120 本立てた放飼場で 1 週間生活させる空間エンリッチメント経験をさせ、社会認知能力、空間認知能力、ストレス負荷時の対処行動の変化を解析している。空間エンリッチメント時の 1 週間の行動も自動行動分析システムを用いて追跡している。このように、明確な分析視点から研究目的を達成するための方法を用いている。

4) 研究の結果

第 1 章では、野生型母マウスは Tbx1 変異仔マウスを養育していたとしても、Tbx1 変異仔マウスの超音波発声への反応性が低いことが示された。兄弟間関係性の解析では、Tbx1 変異マウスは相手が野生型か Tbx1 変異かに関わらず、他個体との交流が社会的報酬とはならず、野生型マウスにおいても相手が Tbx1 変異マウスの場合には、相手が野生型マウスの場合よりも社会的報酬性が低いことが示された。性成熟後に関しても Tbx1 変異マウスは性行動の開始が野生型マウスより遅いことが示された。第 2 章では、空間エンリッチメント環境を経験した VPA マウスは、社会認知能力に変化を示さなかったが空間認知能力が向上することが明らかとなった。またストレス負荷時の対処行動やエンリッチメント環境下での行動には性差の影響も示された。いずれも十分なデータが解析され、実験目的に沿って整理されている。

5) 考察と結論

第 1 章から、Tbx1 の変異に起因する社会認知能力の障害の程度は、同居相手という出生後環境要因によって変化しないことを考察している。第 2 章の VPA マウスの解析からは、空間エンリッチメント環境は胎生期環境に起因する空間認知能力の障害は改善できることを考察している。また今後は遺伝要因と胎生期環境要因に雌雄の性の要素も加えた ASD 表現型追跡の重要性も提言している。いずれも研究結果を踏まえて論理的な考察がなされている。本研究の成果は、ASD 研究において動物モデルによる長期的な表現型解析の重要性を示したものであり、今後の社会行動研究の発展にも大きく貢献できることが期待される。

6) 引用文献

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容、専門分野および外国語の学力、また質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有すると認められる。本研究も動物応用科学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（学術）の学位を授与するに相応しいと判定した。